UNIVERSITA' DI PISA
Istituto di Patologia Vegetale e di Microbiologia Agraria e Tecnica
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

399

G. Picci

DOSAGGIO MICROBIOLOGICO DI ALCUNE VITAMINE E DI ALCUNI AMINOACIDI CEDUTI DAL SEME DURANTE LA GERMINAZIONE

Estratto dagli « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XX - 1959

EDITRICE GIARDINI - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1960

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA

G. PICCI

DOSAGGIO MICROBIOLOGICO DI ALCUNE VITAMINE E DI ALCUN AMINOACIDI CEDUTI DAL SEME DURANTE LA GERMINAZIONE (*)

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO.

Nell'ambito della « Spermosfera » (1) si sono ormai delineati determinanti rapporti esistenti tra seme germinante e terreno. Tali rapporti sono stati studiati, fino ad oggi, da un punto di vista biochimico e microbiologico. Nel primo caso, infatti, è stato messo in evidenza il maggior carico enzimatico (catalasi e saccarasi) presente nel terreno nelle immediate vicinanze del seme germinante rispetto al controllo (2, 3); nel secondo caso, invece, è stata dimostrata l'influenza, positiva ,esercitata sui microrganismi da sostanze che i semi riversano nell'ambiente durante le fasi di imbibizione (4, 5, 6). I risultati della prima delle tre ricerche citate indussero a formulare l'ipotesi — peraltro in linea di massima confermata nella ricerca stessa — che l'azione stimolante l'accrescimento microbico in presenza dei semi o dei liquidi-seme fosse riportabile alla esistenza, nel mezzo, di so-

(*) - Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R.

(1) - VERONA, O. - La « *Spermosphère* ». Ann. de l'Inst. Pasteur, 95, 795. 1958.

(2) - VERONA, P. L. - *L'attività catalasica del terreno in funzione dell'effetto-seme*, Atti Ist. Bot. Pavia, XVI, 290, 1959.

(3) - VERONA P. L. - *Influenza dell'effetto-seme sull'attività saccarasica del terreno*. Ibid., XVII, 1, 1959.

(4) - VERONA, O., PICCI G., GAMBOGI, P. - *Influenza esercitata sui microrganismi delle sostanze che i semi germinanti riversano nel mezzo durante la fase di imbibizione*. L'Agr. Ital. LIX, 61, 1959.

(5) - PICCI, G. - *L'effetto-seme nel terreno saggiato con semi di lino*. Ibid., 155, 1959.

(6) - PICCI, G. - *L'attività ammonozzante del suolo nell'ambito della spermosfera*, Ibid., 216, 1959.

stanze di tipo auxinico. Infatti, liquidi-seme di frumento e senape, opportunamente aggiunti ad un mezzo alimentare, consentivano lo sviluppo di un microrganismo tipicamente auxo-eterotrofo quale *Kloeckera apiculata*. Come riferimmo nel lavoro citato tale ricerca — tenuta presente la sua impostazione sperimentale — rivestiva un valore puramente orientativo.

In questa sede ci proponiamo invece, prendendo le mosse dai risultati ottenuti in precedenza, di studiare più a fondo il fenomeno al fine di poter constatare con maggior esattezza l'esistenza di sostanze di tipo auxinico che dal seme vengono riversate nell'ambiente che lo circonda.

A tale scopo, il lavoro si articola in due parti. Nella prima si considera l'effetto, su base statistica, di determinati liquidi-seme sull'accrescimento di *Kloeckera apiculata;* nella seconda si evidenzia, sempre nei liquidi-seme, la presenza di determinate vitamine e aminoacidi.

I) - Influenza di alcuni liquidi-seme sull'accrescimento di Kloeckera apiculata (Reess emend. Kloecker) Janke.

Materiali e metodi

Semi adoperati: erba medica, lino, trigonella, rapa, grano e senape. Il criterio che ci ha guidato nella nostra scelta è stato quello di considerare semi appartenenti a famiglie diverse e di importanza agronomica.

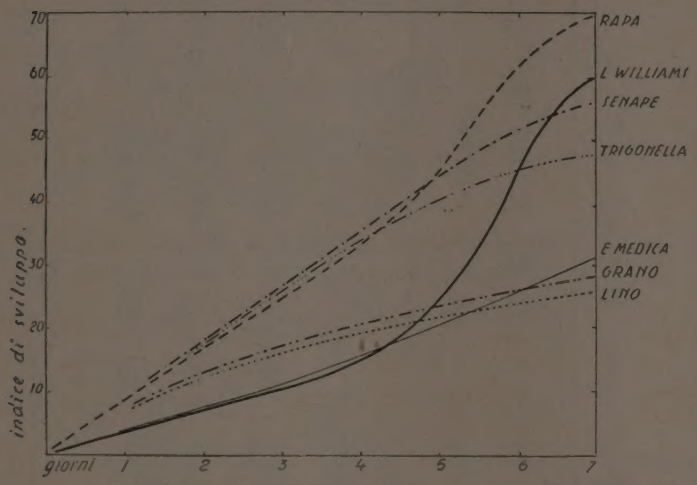
Liquido-seme: come in precedenza è stato ottenuto lasciando in contatto per 24 ore a + 4° C. gr. 15 di seme, previamente lavato, in 100 cc di acqua distillata. Il liquido è stato quindi separato dal seme mediante filtrazione con garza. Determinato a parte il residuo secco contenuto nei singoli liquidi, il volume degli stessi è stato diluito o contratto fino ad ottenere in tutti un residuo pari a 100 mg per 100 cc.

Microrganismo sperimentato: *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Kloecker) Janke, ceppo « Chianti » appartenente alla Collezione dell'Istituto.

Terreno colturale: liquido di Williams distribuito, in ragione di 50 cc, in matraccini da 100 cc (*).

(*) - Il liquido di Williams, completo di vitamine, ha la seguente composizione: glucosio gr. 50; $(NH_4)_2SO_4$ gr. 6; KH_2PO_4 gr. 2; $MgSO_4 . 7H_2O$ gr. 0,25 $CaCl_2$ gr. 0,25; H_3BO_3 (1‰) cc. 1; $ZnSO_4$ (1‰) cc. 1; $MnCl_2$ (1 ‰) c. 1; $TlSO_4$ (1 ‰) cc. 1; $FeCl_3$ (1‰) cc. 1; $CuSO_4$ (1‰) cc. 1; KJ (0,1‰) cc. 1; biotina γ 25; tiamina mg. 0,5; meso-inositolo mg. 25; Ca-pantotenato mg. 2,5; piridossina mg. 0,5; acqua d. fino a 1000 cc.

A) - liquido di Williams senza vitamine
B) - » » » con vitamine
C) - » » » + il 10% di liquido-seme.
(Aggiungendo al liquido di W. il 10% di liquido-seme si veniva così a portare nel substrato mg 10 di residuo per 100 cc).



Sviluppo di *Kl. apiculata* in liquido di Williams integrale e nello stesso liquido privo di vitamine, presente liquido - seme.

Apprezzamento dello sviluppo: a mezzo di nefelometro. E' stata uguagliata a 100 una sospensione standard di *Kl. apiculata* c. Chianti in liquido di Williams e conservata per tutto il corso dell'esperienza in frigorifero previa aggiunta di toluolo. Prove in 6 replicazioni. Lettura al nefelometro al secondo, terzo, quinto e ottavo giorno d'incubazione.

Risultati

I risultati ottenuti figurano nella tabella riportata a pagina seguente.

Allo scopo di poter formulare qualche considerazione conclusiva su tale esperienza, si è proceduto alla elaborazione statistica dei dati. In primo luogo, prima di procedere al confronto tra le medie e dedurne la significatività, abbiamo creduto opportuno stabilire, mediante l'analisi della varianza, l'interferenza dell'errore sui risultati ottenuti. Per ragioni di brevità riportiamo, per ciascun giorno di prova, solamente i valori degli « F » rispettivamente calcolati o trovati sulle appositive tavole.

Tab. 1 - *Indice di sviluppo di KL. APICULATA ceppo «Chianti» in liquido di Williams.*

dopo giorni	Liquido di Williams							
			con l'aggiunta del 10% di liquido-seme di:					
	Senza vitamine	con vitamine	grano	e. medica	rapa	trigonella	lino	senape
1	1,83±0.10	4,66±0,26	8,33±0,56	3,91±0.20	10,6±0,51	6,1 ±0,68	7,71±0,20	9,0 ±0,44
2	assenza di sviluppo	5,91±0,48	16,58±1,35	6,66±0.20	19,92±0,94	15,08±0,77	13,16±0,31	21,58±1,3
4		13,42±1,57	19,66±0,36	15.0±0.81	29,66±1,3	34,83±0,26	18,08±0,79	34,4±1,18
7		60,25±2,0	28,0 ±1.06	30.8±1.30	67,83±0,94	43,08±1,86	26,33±1,31	52,3±1,44

Tab. II - *Valori della « F », rispettivamente calcolato e trovato.* (°)

dopo giorni	F calcolato	F trovato P = 0,01	F trovato P = 0,05
1	47,5	3,15	2,26
2	64,7	3,38	2,38
4	14,0	3,38	2,38
7	604,0	3,38	2,38

(°) I dati relativi al primo giorno si riferiscono a 7 e 40 gradi di libertà, rispettivamente per la varianza maggiore e la varianza minore. I dati dei giorni successivi sono riferiti a 6 e 35 gradi di libertà, poichè dal calcolo sono stati eliminati i risultati della prova senza vitamine essendo nullo l'accrescimento.

Come si vede la prova è risultata altamente significativa, quindi si è proceduto al confronto tra le medie ottenendo i risultati cui alla tab. III.

Tab. III - *Significatività dei risultati mediante il confronto tra le medie*

	Confronto tra le medie	Differenza tra le medie	t	P
dopo 1 giorno	vitamine - grano	4,66 - 8,33 = 3,67	5,9	<0.001 + +
	» - medica	4,66 - 3,91 = 0,75	1,6	>0.1 —
	» - rapa	4,66 - 10,6 = 5.94	10,4	<0.001 + +
	» trigonella	4,66 - 6,1 = 1,44	1,9	>0.1 —
	» - lino	4,66 - 7,71 = 3,05	9,2	<0.001 + +
	» - senape	4.66 - 9,0 = 4,34	8,5	<0.001 + +
dopo 2 giorni	vitamine - grano	5,91 - 16,58 = 10,67	7,4	<0.001 + +
	» - medica	5,91 - 6,66 = 0,75	1,2	>0.2 —
	» - rapa	5,91 - 19,92 = 14,01	13,3	<0.001 + +
	» trigonella	5,91 - 15,1 = 9,19	10,2	<0.001 + +
	» - lino	5,91 - 13,16 = 7,25	12,8	<0.001 + +
	» - senape	5,91 - 21,58 = 15,67	11,3	<0.001 + +
dopo 4 giorni	vitamine - grano	13,42 - 19,66 = 6,24	3,88	<0.01 +
	» - medica	13,42 - 15,0 = 1,58	1,69	>0,1 —
	» - rapa	13,42 - 29,66 = 16,24	11,8	<0.001 + +
	» trigonella	13,42 - 34,83 = 21,41	39,5	<0.001 + +
	» - lino	13,42 - 18,08 = 4,66	5,07	<0.01 +
	» - senape	13,42 - 34,4 = 20,98	16,5	<0.001 + +
dopo 7 giorni	vitamine - grano	60,25 - 28,0 = 32,25	14,0	<0.001 + +
	» - medica	60,25 - 30,8 = 29,45	12,2	<0.001 + +
	» - rapa	60,25 - 67,83 = 7,58	3,36	<0.01 +
	» trigonella	60,25 - 43,08 = 17,17	6,2	<0.001 + +
	» - lino	60,25 - 26,33 = 33,92	14,0	<0.001 + +
	» - senape	60,25 - 52,3 = 7,95	3,17	<0.001 + +

Leggenda: + + = altamente significativa + = significativa — = non significativa
Limite di significatività: *P* = 0,05

Discussione dei risultati

Dai risultati ottenuti si può quindi dedurre che, in presenza dei liquidi-seme saggiati, si ha indubbiamente un'azione di stimolo nell'accrescimento di *Kl. apiculata*. Tale azione non si manifesta uguale per tutti i liquidi-seme adoperati, riscontrandosi delle sensibili differenze, ad esempio, tra la rapa e la senape da una parte ed il grano, lino ed erba medica dall'altra. A parte questo fatto rimane indiscutibile che, mentre in assenza di vitamine il microrganismo test non sviluppa, in presenza di determinati liquidi-seme, tale accrescimento si avvicina o addirittura supera quello che si ottiene quando siano presenti tutte le vitamine che normalmente figurano nel liquido di Williams.

Considerata la quantità veramente esigua di sostanza che viene apportata al mezzo alimentare con l'aggiunta dell'aliquota del liquido-seme, viene fatto di escludere aprioristicamente il fattore, diremmo, *macrotrofico*. Ciò che la logica, corroborata dalle nostre conoscenze, ci porta a considerare è invece il probabile apporto, al mezzo, di sostanze di tipo auxinico. Tali sostanze, ovviamente presenti nel seme, verrebbero cedute da questo all'ambiente durante la fase di imbibizione. Nel nostro caso il liquido-seme dovrebbe presuntivamente contenere una certa somma di tali sostanze le quali, aggiunte al mezzo base privo di vitamine, lo hanno reintegrato rendendolo atto allo sviluppo ottimale di *Kl. apiculata*.

II) - Presenza in alcuni liquidi-seme di determinate vitamine e aminoacidi.

A dimostrazione di quanto formulavamo più sopra, abbiamo ricercato in alcuni liquidi-seme una serie di vitamine e aminoacidi. Come è noto, anche a proposito di questi ultimi valgono analoghe considerazioni che si riferiscono alle vitamine. Vogliamo cioè riferirci agli aminoacidi così detti *stimolanti* che proprio nel nostro caso possono essere invocati per ragioni quantitative.

Materiali e metodi

In tutte le nostre ricerche abbiamo adoperato metodi microbiologici, servendoci dei terreni colturali e delle modalità tecniche suggeriti dal «Difco Manual» (7). Fanno eccezione le vitamine B_1 e B_6 per le quali abbiamo

(7) - Difco Manual of Dehydrated Culture, Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. Detroit, 1953.

adoperato un metodo recentissimo messo a punto da PRINCIVALLE (8). Per quanto concerne la prima e più numerosa serie di ricerche, abbiamo adoperato il metodo opacimetrico servendoci dei noti fermenti lattici titolatori. E precisamente, per i dosaggi vitaminici: *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 per la cianocobalamina; *Lactob. casei* e 7469 ATCC per la riboflavina; *Lactob. arabinosus* 17-5 ATCC 8014 per la niacina, per il Ca-pantotenato e per la biotina. Per i dosaggi degli aminoacidi: *Leuconostoc mesenteroides* P-60 ATCC 8042 per la leucina, metionina, lisina .isoleucina, arginina, tirosina e fenil-alanina; *Lactob. arabinosus* 17-5 ATCC 8014 per il troptofano.

Tali microrganismi sono stati coltivati negli appositi terreni nutritivi « test » della Difco i quali, come è noto, contengono tutti i principi nutritivi necessari per l'accrescimento del microrganismo titolatore meno uno, quello che si vuol ricercare. Quest'ultimo (una vitamina od un aminoacido) viene aggiunto al terreno-base in concentrazioni opportune, seriate e crescenti dando luogo così ad una curva (curva standard). Quest'ultima si confronta con una curva analoga, quella campione, la quale si ottiene ponendo nel terreno base, in luogo della vitamina o aminoacido puri, quantità seriate e crescenti del campione da esaminare .Tali quantità vengono scelte in modo tale che il contenuto della sostanza incognita rientri nei limiti di concentrazione della curva .A questo punto sarà possibile risalire alla concentrazione unitaria della sostanza ricercata attraverso l'intensità dell'accrescimento microbico.

Per quanto concerne la titolazione della tiamina e della piridossina, i germi titolatori sono stati rispettivamente *Penicillium chrysogenum* Istisan 152 e *Neurospora sitophila* 299 ATCC 9276. L'esperienza è stata condotta su terreno solido (agar-base) distribuito in capsule di vetro rettangolari. Esprimendoci molto brevemente, diremo che in questo caso si risale al titolo vitaminico attraverso la misura del diametro delle colonie fungine che si sviluppano attorno ai cilindretti di porcellana (gli stessi che si adoperano per i saggi con gli antibiotici) nei quali si pongono — analogamente ai metodi precedenti — soluzioni seriate e crescenti di vitamina o di campione. In presenza della vitamina ricercata si ottiene, attorno al cilindretto stesso, una colonia fungina circolare il cui diametro varia linearmente con il logaritmo della dose vitaminica incognita.

---

(8) - PRINCIVALLE, M. - *Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. I. Un nuovo metodo per la titolazione della tiamina.* Rend. Ist. Sup. Sanità, Roma, XXI, 701, 1958.

PRINCIVALLE, M. - *Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. II. Titolazione della vitamina B_6.* Ibid., 713.

Nelle nostre ricerche analitiche abbiamo preso in considerazione solamente tre liquidi-seme: trigonella, senape e rapa. L'estensione dello studio a tutti i semi considerati nella prima parte del lavoro, anche se interessante, avrebbe richiesto un tempo eccessivo data la natura dei metodi di ricerca. D'altra parte, prendendo dei liquidi-seme che hanno dato una risposta altamente significativa nei riguardi dell'accrescimento di *Kl. apiculata*, era supponibile — come poi i risultati hanno confermato — che molte sostanze di tipo auxinico fossero presenti. Per quanto riguarda la preparazione dei liquidi-seme ci siamo comportati come già descritto in precedenza. I risultati ottenuti si sono espressi in unità di peso (gamma) di vitamina o aminoacido per cc di liquido-seme oppure per grammo di seme (peso secco).

Tab. IV - *Contenuto in alcune vitamine ed aminoacidi in alcuni liquidi-seme.* (°)

		trigonella		senape		rapa	
		γ/cc di liquido-seme	γ/gr di seme	γ/cc di liquido-seme	γ/gr di seme	γ/cc di liq.-seme	γ/gr di seme
vitamine	tiamina	0,2	2,5	0,15	4,2	0,2	0,5
	riboflavina	0,8	10,0	0,8	22,0	0,7	1,7
	piridossina	0,9	11,0	0,6	17,0	1,2	3,0
	cianocobalamina	0,00002	0,00025	0,00015	0,0004	0,00015	0,00037
	niacina	0,2	2,5	0,4	11,5	0,5	1,2
	Ca-pantotenato	0,6	7,5	0,35	10,0	0,7	1,7
	biotina	0,0003	0,0037	0,00025	0,0007	0,0005	0,0015
amino-acidi	leucina	2,0	25,0	1,8	51,5	6,0	15,0
	metionina	1,2	15,0	1,5	42,0	3,0	7,5
	lisina	0	0	2,0	57,0	4,0	10,0
	isoleucina	tr.	tr.	tr.	tr.	1,5	3,7
	arginina	1,8	22,5	2,0	57,0	1,5	3,7
	tirosina	2,0	25,0	1,0	28,5	2,0	5,0
	fenil-alanina	2,0	25,0	0,8	23,0	tr.	tr.
	triptofano	tr	tr.	1,2	34,0	2,0	5,0

(°) - Nel considerare i quantitativi riferibili a grammo di seme si deve tenere presente la diversa quantità di seme che, a parità di liquido, si rende necessario per ottenere nel medesimo mg. 100 di residuo secco per 100 cc..

A proposito dei risultati ottenuti gioverà appena sottolineare che le cifre reperite non rappresentano evidentemente il risultato di un'analisi chi-

mica quantitativa di determinate vitamine ed aminoacidi contenuti nei semi studiati: rappresentano semplicemente i quantitativi delle sostanze elencate che, nelle particolari condizioni sperimentali da noi realizzate, passano dal seme all'acqua. Possiamo inoltre aggiungere che, a nostro avviso, tali risultati hanno un valore più qualitativo che quantitativo, in quanto si comprenderà facilmente come tali dati siano soggetti a variazioni in rapporto a condizioni di temperatura, durata del tempo di imbibizione, condizioni del tegumento dei semi, varietà agronomiche degli stessi, ecc. Tuttavia, prescindendo da queste considerazioni, rimane indiscusso il fatto che nei liquidi-seme saggiati sono presenti le elencate sostanze.

Conclusioni

I risultati che il presente lavoro ci fornisce hanno evidenziato, almeno in certa misura, alcuni aspetti nel meccanismo dell'effetto-seme nei riguardi della flora microbica nell'ambito della spermofera. Già nella nota precedente, alla quale ci siamo spesso riferiti, avevamo constatato alcuni aspetti, senza dubbio favorevoli, che i liquidi-seme sortivano nei confronti microbici. A rigor di logica formulammo l'ipotesi che le sostanze che il seme cede all' ambiente durante la fase di imbibizione fossero, almeno in prevalenza, sostanze stimolanti l'accrescimento Tale ipotesi è stata pienamente confermata dalle presenti esperienze. L'analisi avrebbe potuto essere estesa ad un più vasto gruppo di vitamine e aminoacidi, nonchè di liquidi-seme, ma, almeno per una prima conclusione, i dati da noi ottenuti riteniamo che siano sufficienti. Ovviamente gli stessi dati non possono essere generalizzati, in quanto non è affatto detto che tutti i semi si comportino in maniera analoga; potremmo tuttavia affermare che l'ambiente microbico, indicato come spermosfera, risente senza dubbio dell'attività del seme germinante, risultandone una serie di azioni assai complesse che interreagiscono tra di loro. Che poi tali azioni sortano un effetto positivo o meno nei confronti dell'attività microbica — *lato sensu* — ciò dipenderà dall'intrinseca natura del seme considerato, dalle condizioni dell'ambiente e da un complesso di altri fattori i quali, insieme considerati, determineranno la *natura* ed *intensità* dell'effetto-seme.

Riassunto. — *Viene dimostrata l'influenza che i liquidi-seme di erba medica, lino, trigonella, rapa, grano e senape hanno nei confronti dell'accrescimento di* Kloeckera apiculata *(Reess emend. Kloecker) Janke. Infatti i*

risultati, valutati statisticamente ,hanno dimostrato che tale microrganismo, coltivato in liquido di Williams, raggiunge — in presenza di determinati liquidi-seme — uno sviluppo pari o addirittura superiore a quello registrato nel liquido colturale completo di vitamine. Ancora nei ricordati liquidi-seme vengono saggiate determinate vitamine e aminoacidi alle quali sostanze si deve lo stimolo nello accrescimento del microrganismo test.